

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-048821

(43)Date of publication of application : 23.02.1989

(51)Int.Cl.

C08G 63/06
A01N 25/10
C08G 63/40
C12N 1/20
C12P 7/62
// (C12N 1/20
C12R 1:05)
(C12P 7/62
C12R 1:05)

(21)Application number : 62-204538

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 18.08.1987

(72)Inventor : DOI YOSHIHARU

(54) POLYESTER COPOLYMER AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the title copolymer of excellent impact resistance, by multiplying microorganisms having an ability of producing poly-3-hydroxybutyrate in the former stage and multiplying them in the presence of a specified compound under culture conditions of limited N or P in the latter stage.



CONSTITUTION: Microorganisms having an ability of producing poly-3- hydroxybutyrate (e.g., *Alcaligenes eutorophus*) are multiplied in the former stage under culture conditions of a pH of 6W10 and 20W40° C and multiplied in the presence of a compound of the formula (wherein X is OH or a halogen, n is 1W4, and Y is H or mono- to tetra-valent metal atom), e.g., 4- hydroxybutyric acid, to allow the bacteria to form and accumulate poly-3- hydroxybutyrate in their cells. The cells are recovered, and washed and dried, and a poor solvent is added to the cells to obtain the title copolymer comprising 97W40mol.% 3- hydroxybutyrate units and 3W60mol.% 4- hydroxybutyrate units and having an intrinsic viscosity (in chloroform at 30° C) of 0.4W10.0dl/g.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-48821

⑬ Int. Cl.⁴
 C 08 G 63/06
 A 01 N 25/10
 C 08 G 63/40
 C 12 N 1/20
 C 12 P 7/62
 //(C 12 N 1/20
 C 12 R 1:05)
 (C 12 P 7/62
 C 12 R 1:05)

識別記号

NLP

NLK

庁内整理番号

6904-4J

7215-4H

6904-4J

A-8515-4B

7236-4B

⑭ 公開 昭和64年(1989)2月23日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑮ 発明の名称 ポリエステル共重合体およびその製造法

⑯ 特 願 昭62-204538

⑰ 出 願 昭62(1987)8月18日

⑱ 発 明 者 土 肥 義 治 神奈川県横浜市旭区今宿町2617-39

⑲ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

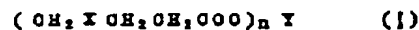
1 発明の名称

ポリエステル共重合体およびその製造法

2 特許請求の範囲

(1) α -ヒドロキシブチレート単位 α 〜 κ 0
 モル分および κ -ヒドロキシブチレート単位
 β 〜 ϵ 0モル分からなり、 β 0℃クロロホル
 ム中で測定した $[\eta]$ が $0.4 \sim 10.0 \text{ dl/g}$ の範
 囲にあるポリエステル共重合体

(2) ポリ- α -ヒドロキシブチレート生産能を
 有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後
 段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培
 養して該菌体内にポリ- α -ヒドロキシブチ
 レートを生成、蓄積させるに際して、後段の
 培養を下記一般式(1)で表わされる化合物の
 存在下におこなうことを特徴とする α -ヒド
 ロキシブチレート単位および κ -ヒドロキシ
 ブチレート単位からなるポリエステル共重合
 体の製造法。



(但し、式中Xはヒドロキシル基または
 ハロゲン原子を、 α は \sim 〜 κ の整数を、
 Yは水素原子または \sim 〜 ϵ 個の金属原子
 を示す。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は α -ヒドロキシブチレート単位(以
 下 α HB成分と記す)および κ -ヒドロキシブ
 チレート単位(以下 κ HB成分と記す)を含有
 する共重合体およびその製造法に関し、さらに
 詳しくはポリエステルを蓄積できる微生物を用
 いて製造される α HB成分と κ HB成分からな
 る新規の共重合ポリエステル及びその製造法に
 関する。

(従来の技術)

ポリ- α -ヒドロキシブチレート(PHB)は、
 エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌
 体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合
 性を示す熱可塑性高分子であることから、環境
 を保全する“クリーン”プラスチックとして注

目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなどの多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、P H B は石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、P H B は剛直なポリマーのため、耐衝撃性に欠けるという物性上の問題を持ち、用途展開が困難との理由から工業的生産が見送られてきた。そこでこの耐衝撃性改良を目的にした研究が鋭意なされてきた。

例えば特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報には共重合成成分としてγ-ヒドロキシブチレート(以下γHV成分と記す)を含むP H B 共重合体が開示されている。これらの公報では、従来のP H B の製造法と同様に、前段では菌体を増殖させ、後段では窒素あるいはリンを制限して微生物を増殖

し、共重合体を製造するものである。このγHV-γHV共重合体は柔軟性に富み、材料として有望ではある。しかしながらγHV成分が増大すると、これに伴った融点(T_m)降下が著しく、例えばγHVが25モル%でのT_mは約120℃まで低下してしまふ。更にγHV含量の変化に伴う融点の変化が激しい為、工業的に均一な製品を得ることは極めて困難な状況にあった。

(問題を解決するための手段)

本発明者は以上の点に鑑み、P H B に柔軟性を賦与すると同時に比較的高く、かつ安定した融点を示す共重合体を得るべく鋭意検討した結果、後段の窒素あるいはリンを制限する培養に於いて、特定の化合物の存在下でP H B 生産能を有する微生物を増殖するとこの菌体中に、目的とする共重合体が生成、蓄積することを見出し本発明に到達した。すなわち本発明は、

(1) γ-ヒドロキシブチレート単位97~99モル%およびε-ヒドロキシブチレート単位

3~60モル%からなり、30℃クロロホルム中で測定した[η]が0.4~10.0 dl/g の範囲にあるポリエステル共重合体。

(2) ポリ-γ-ヒドロキシブチレート生産能を有する微生物を、前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-γ-ヒドロキシブチレートを生成、蓄積させるに際して、後段の培養を下記一般式(1)で表わされる化合物の存在下におこなうことを特徴とするγ-ヒドロキシブチレート単位およびε-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造法

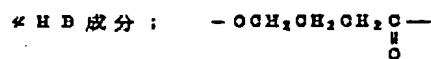
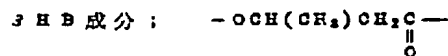


但し、式中Xはヒドロキシル基またはハロゲン原子を、nは1~4の整数を、Yは水素原子または1~4個の金属原子を示す。

に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において共重合体に含有されるγHV成分およびεHV成分はそれぞれ次式であらわされる。



本発明で使用する微生物は、P H B 生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フェカリス(*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネス ルーランディイ(*Alcaligenes ruhlandii*)、アルカリゲネス ラタス(*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス(*Alcaligenes aquamarinus*)およびアルカリゲネス ユウトロフス(*Alcaligenes eutropha*)等のアルカリゲネス属などがある。

これらの菌種に属する菌株の代表例として、アルカリゲネス フェカリス ATCC 8739、アルカリゲネス ルーランディイ ATCC 15749、

アルカリゲネス ラタス ATCC 29712、アルカリゲネス アタマリヌス ATCC 14400 ならびにアルカリゲネス ユウトロフス H-14 ATCC 17499 およびこの H-14 株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11597、同 NCIB 11598、同 NCIB 11599、同 NCIB 11600 などを挙げることができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフス H-14 ATCC 17499 およびアルカリゲネス ユウトロフス NCIB 11599 が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、"BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore" に、また、アルカリゲネス ユウトロフス H-14 の菌学的性質は、たとえば、J. Gen. Microbiol., 115, 185~192 (1979) にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主

エキスをなどの有機窒素含有物ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、炭化化合物およびより炭化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20~40℃程度、好ましくは25~35℃程度とされ、また、pHは、たとえば、6~7.5程度、好ましくは6.5~7.5程度とされる。このような条件で好氣的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに

として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成蓄積させる後段の培養との二段で培養される。

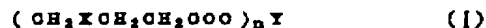
前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が変化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源としては、たとえば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および／または、たとえば、尿素、コーン・スティープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉

窒素および／またはりん制限条件下で培養する。

すなわち、前段の培養で得られた培養液から微生物の菌体を、伊過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および／またはりんを実質的に枯渇させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってもできる。

この後段の培養においては、培地または培養液に窒素および／またはりんを実質的に含有せず、かつ、下記一般式(I)で表わされる化合物を炭素源として含有させる以外には、前段の培養と異なるところはない。



但し、式中Xはヒドロキシル基またはハロゲン原子を、nは1~4の整数を、Yは水素原子あるいは1~4価の金属原子を示す。

一般式(I)で表わされる化合物としては具体的に、 α -ヒドロキシ酸、 α -クロロ酸、 α -ブromo酸等の酸誘導体およびそれぞれのナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩等を挙げることができる。

かかる一般式(I)で表わされる化合物は、後段の培養における培地もしくは培養液に含有せしめられる。後者の場合には、培養の初期乃至終期のどの時点でも良いが培養の初期が好ましい。

一般式(I)で表わされる化合物の使用量は、共重合体を生成させることができ、かつ、微生物の生育を阻害しないような量であればよく、使用した微生物の菌株および共重合体中の α HB成分の所望の割合などによって異なるが、一般に培地もしくは培養液の一般式(I)で表わされる化合物の比率を高くすると、共重合体中の α HB成分の割合が多くなる。通常は、培地もしくは培養液1ℓ当り、一般式(I)で表わされ

る化合物として3~50g程度、好ましくは5~30g程度である。

この後段の培養においては、一般式(i)で表わされる化合物を唯一の炭素源としてもよいが、使用した微生物が酸化し得る他の炭素源—たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、 α -酸、および乳酸など—を少量共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くても1.5g/ℓ程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、伊通および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得、この乾燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈降させる。

本発明の製造法によって、適切な反応条件をとれば共重合体中の β HB成分に対する α HB

成分の割合は任意に調節することができる。そして本発明によって得られる共重合体は、比較的高く、かつ安定した融点を保持しつつ、結晶化度が小さい柔軟性に富んでいる。そこで紡糸および圧延等の成形性が良く、また得られた繊維やフィルム等の成形品は、しなやかで、かつ強靱である。

〔実施例〕

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1〜7及び比較例1

アルカリグネス ユウトロフス H-16 ATGO 17697を使用して共重合体を製造した。すなわち、

前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を30℃で24時間培養し、対数増殖期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

前段培養用培地の組成

酵母エキス	10g	ポリペプトン	10g
肉エキス	5g	(NH ₄) ₂ SO ₄	5g

これらを脱イオン水1ℓに溶解し、pH7.0に調整した。

後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地に、1ℓあたり5gの割合で懸濁させ30℃で48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

後段培養用培地の組成

0.5M	りん酸水素カリウム水溶液	39.0 ml
0.5M	りん酸水素二カリウム水溶液	53.6 ml
20wt%/ℓ	硫酸マグネシウム水溶液	1.0 ml

炭素源*

ミネラル溶液** 1.0 ml

*炭素源として後記表1の割合で、 α -ヒドロキシ酸および酸を使用した。

(単位 g/ℓ 培地)

** ミネラル溶液

CoCl_2	119.0 ㎖
FeCl_3	9.7 9
CaCl_2	7.8 9
NiCl_2	118.0 ㎖
CrCl_3	62.2 ㎖
CaSO_4	156.4 ㎖

を 0.1 N-HCl / L に溶解

これらを脱イオン水 / L に溶解し、pH 7.0 に調整した。

菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸留水で洗浄し、引続きアセトンで洗浄し、これを減圧乾燥 (20℃、0.1 mmHg) して乾燥菌体を得た。

共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重合体を沈澱させ、この沈澱を回収、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた¹H-NMR の組成、固有粘度を調べるようにして測定した。すなわち、

組成：¹H-NMR スペクトルによる。

固有粘度 (η)：30℃、クロロホルム中。

測定結果などを第1表に示す。

尚、実施例4の500 MHz ¹H-NMR スペクトル及び125 MHz、¹³C-NMR スペクトルを図1及び図2に各々示した。

表 1

	炭 素 源 (9)		乾燥菌体重量 (9)	共重合体含有率 (%)	共重合体組成 (モル%)		(η) (dl/g)
	α-ヒドロキシ酪酸	酪酸			βHB	αHB	
実施例 1	4	0	2.8	7	75	25	—
" 2	8	0	3.3	14	74	26	—
" 3	12	0	4.1	18	74	26	—
" 4	16	0	3.5	19	73	27	4.3
" 5	20	0	2.9	19	69	31	—
" 6	24	0	3.5	13	66	34	4.0
" 7	28	0	3.5	8	64	36	—
比較例 1	0	20	9.6	51	100	0	3.3
実施例 8	4	13	8.5	53	95	5	—
" 9	8	10	7.6	48	87	13	3.9

実施例 10

後段培養における炭素源として α -タクロン酸を1g当り1.5g使用したこと以外は実施例1と同様の操作により得た共重合体の結果を、表2に示す。

表2のうち連鎖分布、融解温度および融解熱は次の様にして測定した。

連鎖分布：本発明者およびその他の方法(Y.

Doi et al, *Macromolecules*, 19, 2860~2864(1986))に従いカルボニル炭素の多重共鳴構造から推定。

融解温度：DSC測定による(昇温速度 10℃/min)

融 解 熱：DSC測定による

尚、元素分析における O, H, O_2 の計算値は下記のとおりである。

O H

55.5% 7.02%

実施例 11

後段培養における炭素源として α -ヒドロキシ酪酸ナトリウムを1g当り2.0g使用したこと

と以外は実施例10と同様の操作により得た共重合体の結果を表2に示す。

実施例 12

アルカリゲネス ニウトロフス NCIB 11599を使用したこと以外は実施例11と同様の操作により得た共重合体の結果を表2に示す。

表 2

	乾燥菌体 重量(g)	共重合体 含有率(%)	共重合体組成 (モル%)		連鎖分布 (モル%)				〔η〕 (dl/g)	融解温度 (℃)	融解熱 (cal/g)	元素分布		
			FHB	αHB	〔FHB -FHB〕	〔FHB -αHB〕	〔αHB -FHB〕	〔αHB -αHB〕				O	H	O1
実施例 10	3.1	27	89	11	82	9	9	0	3.9	136	11.1	55.50	7.09	0.29
" 11	3.7	30	67	33	33	13	13	19	2.9	166	3.7	55.60	6.64	—
" 12	4.3	20	31	69	32	21	19	28	6.1	139	0.3	55.18	6.93	—
比較例 1	9.5	51	100	—	100	0	0	0	3.3	177	19.5	55.88	7.34	—

〔発明の効果〕

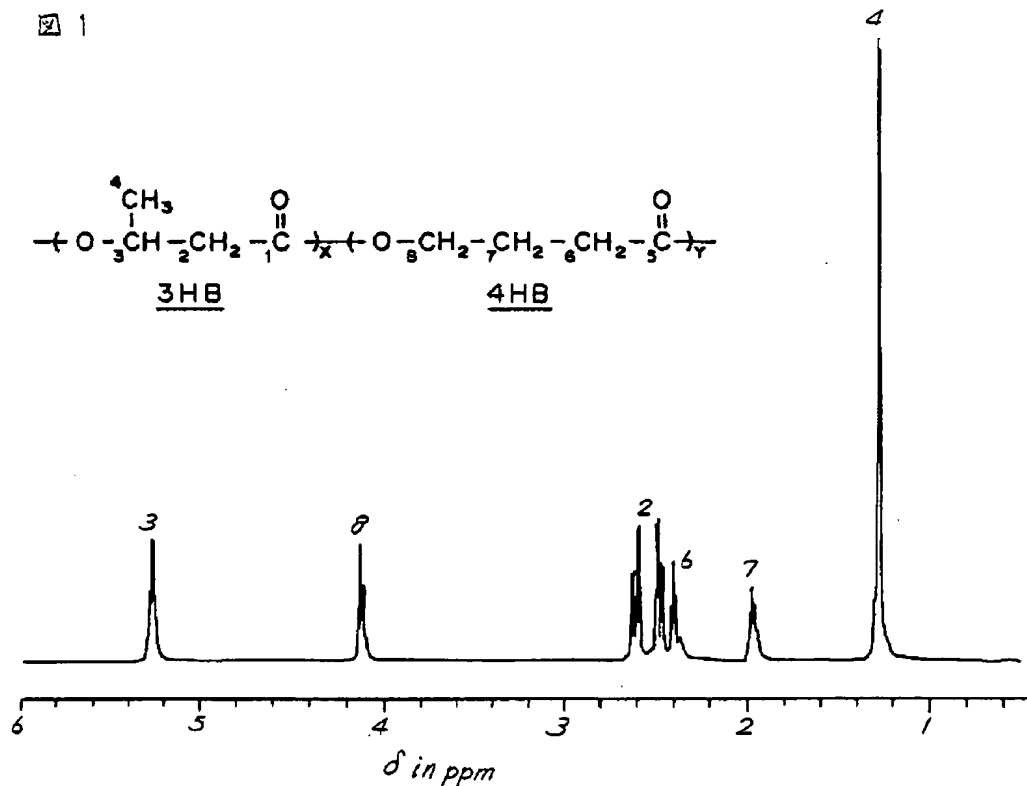
本発明によれば 3HB 成分と 4HB 成分を含む新規のポリエステル共重合体を容易に得ることができる。

さらに、本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また、徐放性システムへの利用などの多方面への応用が期待される。

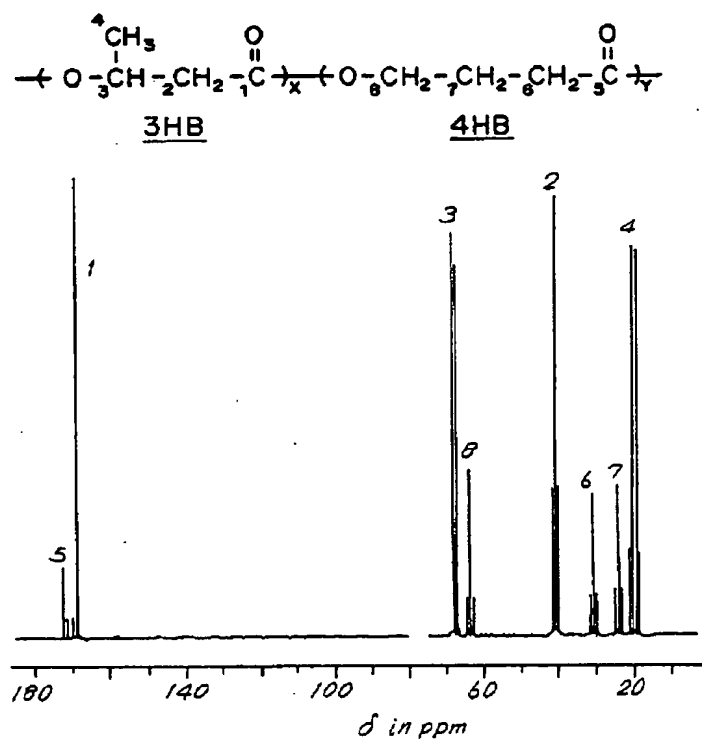
* 図面の簡単な説明

図1は実施例4で得られた共重合体の 500 MHz、¹H-NMR スペクトルを、図2は同じく実施例4で得られた共重合体の 125 MHz、¹³C-NMR スペクトルである。図中の構造式に付した数字は各々ピークの数字に対応するものである。

出 願 人 三菱化成工業株式会社
代 理 人 弁 理 士 長谷川 一
ほかノ名



2



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**